

**ĐẠI HỌC QUỐC GIA HÀ NỘI
TRƯỜNG ĐẠI HỌC KHOA HỌC TỰ NHIÊN**

HÀ THỊ MINH TÂM

**NGHIÊN CỨU MÔ HÌNH BỆNH LOÃNG XƯƠNG TRÊN
CÁ MEDAKA CHUYỂN GEN VÀ SÀNG LỌC CHẤT CÓ
HOẠT TÍNH CHỐNG LOÃNG XƯƠNG**

Chuyên ngành: Sinh lý người và động vật

Mã số: 9420101.04

(DỰ THẢO) TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SĨ SINH HỌC

Hà Nội - 2022

Công trình được hoàn thành tại:
Trường Đại học Khoa học Tự nhiên - ĐHQGHN

Người hướng dẫn khoa học:
TS. Tô Thanh Thúy, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên - ĐHQGHN

Phản biện:

.....

Phản biện:

.....

Phản biện:

.....

Luận án sẽ được bảo vệ trước Hội đồng đánh giá luận án tiến sĩ họp tại

Trường Đại học Khoa học tự nhiên - ĐHQGHN

vào hồi giờ ngày tháng năm 2022

Có thể tìm hiểu luận án tại:

- Thư viện Quốc gia Việt Nam

- Trung tâm Thư viện và Tri thức số , Đại học Quốc gia Hà Nội

MỞ ĐẦU

Tính cấp thiết của đề tài

Loãng xương là bệnh xương thường gặp ở người lớn tuổi, đặc biệt là phụ nữ tuổi mãn kinh, trên thế giới hàng năm có tỉ lệ người bị loãng xương và tử vong do loãng xương tăng. Việc điều trị loãng xương tương đối tốn kém gây gánh nặng kinh tế cho xã hội, mặt khác thuốc điều trị lại có nhiều tác dụng phụ gây hại cho người bệnh. Vì vậy việc tìm ra các thuốc điều trị mới hiệu quả, an toàn, ít tác dụng phụ đang được các nhà khoa học trên thế giới quan tâm nghiên cứu, mục tiêu hướng đến là các chất có nguồn gốc tự nhiên. Tuy nhiên, để sàng lọc được các chất có tiềm năng chống loãng xương từ nguồn dược liệu phong phú này, cần phải có mô hình phù hợp đáp ứng được mục tiêu sàng lọc lượng lớn hợp chất và cá medaka *rankl:HSE:CFP* có nhiều đặc điểm ưu việt trong việc dùng làm mô hình bệnh loãng xương. Bên cạnh đó, ở Việt Nam hiện nay chưa có nhiều nghiên cứu về loãng xương hay sàng lọc chất chống loãng xương nào được thực hiện trên mô hình cá này. Xuất phát từ thực tiễn trên, và với mong muốn tìm ra một số hợp chất tự nhiên và tổng hợp có tiềm năng chống loãng xương chúng tôi đã thực hiện đề tài “Nghiên cứu mô hình bệnh loãng xương trên cá medaka chuyển gen và sàng lọc chất có hoạt tính chống loãng xương”.

Đối tượng và phạm vi nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu của luận án là cá medaka chủng đại, cá *rankl:HSE:CFP* và cá chuyển gen chỉ thị cho tế bào tạo xương *collagen10a1:nlGFP*. Nghiên cứu được thực hiện tại phòng thí nghiệm Bone Med - Bộ môn Sinh lý học và sinh học người, trường ĐHKHTN-ĐHQGHN

Phương pháp nghiên cứu

Các phương pháp nghiên cứu được sử dụng trong luận án gồm phương pháp tạo kiểu hình loãng xương để gây mô hình nghiên cứu, phương pháp chụp ảnh và phân tích ảnh bằng phần mềm Image J dùng để xác định chỉ số khoáng hóa xương I_M ; chỉ số tổn thương xương I_D , chỉ số bảo vệ xương I_p . Mật độ tín hiệu huỳnh quang chỉ thị cho tế bào tạo xương được xác định bằng phương pháp phân tích ảnh chụp huỳnh quang Apotome qua phần mềm ZEN. Chênh lệch mức độ biểu hiện gen giữa các nhóm nghiên cứu được thực hiện bằng phương pháp realtime qPCR.

Ý nghĩa khoa học và thực tiễn của nghiên cứu

Nghiên cứu đã hoàn thiện được quy trình đánh giá tác dụng bảo vệ xương của chất trên cá medaka. Bên cạnh đó, kết quả nghiên cứu còn chỉ ra tác dụng bảo vệ xương của Bisphosphonates (một thuốc điều trị loãng xương phổ biến trên người) cho thấy hiệu quả của mô hình cá trong nghiên cứu phát triển các thuốc chống loãng xương. Đặc biệt, kết quả nghiên cứu cũng cho thấy DMSO (một dung môi được sử dụng phổ biến trong các phòng thí nghiệm để pha các hợp chất khó tan) có ảnh hưởng

đến mức độ khoáng hóa của xương. Điều này đã cung cấp thêm dữ liệu về tác dụng của DMSO đối với xương và do đó đưa ra những khuyến nghị về việc sử dụng chất này trong các nghiên cứu về loãng xương. Lần đầu tiên, nghiên cứu đã chứng minh được tác dụng chống loãng xương của chất tổng hợp NecroX-5 và cho thấy đây là chất có tiềm năng phát triển thành thuốc điều trị loãng xương. Đồng thời, chúng tôi cũng đã khẳng định được sự tương đồng về ảnh hưởng của chất tự nhiên Resveratrol làm ức chế hủy xương của mô hình cá so với các mô hình động vật có vú.

Cấu trúc của luận án

Luận án bao gồm 4 chương, trong đó chương 1 trình bày tổng quan về vấn đề nghiên cứu; chương 2 trình bày về sơ đồ nghiên cứu; chương 3 trình bày về các phương pháp nghiên cứu và chương 4 trình bày về các kết quả nghiên cứu. Cuối cùng là kết luận, hướng phát triển của luận án.

CHƯƠNG I. TỔNG QUAN TÀI LIỆU

1.1. Bệnh loãng xương và thực trạng về bệnh

Loãng xương là bệnh xương phổ biến đặc trưng bởi sự suy giảm mật độ và cấu trúc xương, dẫn đến tăng nguy cơ gãy xương. Trên thế giới hàng năm có khoảng 200 triệu người bị loãng xương và khoảng 8,9 triệu người bị gãy xương, trong đó chủ yếu là gãy xương hông [7]. Ở Việt Nam, nghiên cứu cho thấy phụ nữ sau mãn kinh, cứ 100 người thì có 25 - 30 người; nam giới trên 50 tuổi, cứ 100 người thì có 10 người bị loãng xương.

1.2. Cấu tạo và chức năng của mô xương

Mô xương là mô liên kết đặc biệt luôn có khả năng tự đổi mới và có nhiều chức năng trong cơ thể. Mô xương gồm có các tế bào xương được bao quanh bởi chất nền xương (bone matrix) là dịch ngoại bào được khoáng hóa. Các loại tế bào xương chính bao gồm tế bào tạo xương (osteoblast), tế bào hủy xương (osteoclast) và tế bào xương (osteocyte) [18].

1.3 Các loại tế bào xương và hoạt động chuyển hóa ở mô xương

Xương phát triển theo sự phát triển của cơ thể, luôn đổi mới trong suốt cuộc đời nhờ hoạt động chuyển hóa được thực hiện nhờ các tế bào xương bao gồm tế bào tạo xương, tế bào hủy xương và tế bào xương trong các quá trình mô hình (bone modeling) và tái mô hình hay tái tạo xương (bone remodeling) [22].

1.3.1. Tế bào tạo xương (osteoblast)

Tế bào tạo xương có nguồn gốc từ tế bào gốc trung mô (mesenchymal stem cells (MSCs)), chiếm 5% trong tổng số các tế bào của mô xương. Vai trò của tế bào tạo xương là sản xuất chất nền xương (bone matrix). Đặc biệt, tế bào tạo xương còn tiết ra các yếu tố điều hòa sự biệt hóa và hoạt động của tế bào hủy xương như

RANKL, MCSF[28]. RANKL cũng hoạt động như một thụ thể tác động ngược trở lại đối với hoạt động của tế bào tạo xương, cụ thể RANKL kích thích quá trình tái tạo xương [29].

1.3.2. Tế bào xương (osteocyte)

Tế bào xương chiếm hơn 90% tổng các tế bào có trong mô xương và có ở cả mô xương đặc và xương xốp, được phát triển từ tế bào tạo xương được nằm trong chất nền xương và được chuyển từ hình dạng đa giác sang hình dạng tế bào có nhiều tua nhánh, các tua nhánh này liên kết các tế bào xương với nhau.

1.3.3. Tế bào hủy xương (osteoclast)

Tế bào hủy xương có nguồn gốc từ bạch cầu đơn nhân và đại thực bào (monocyte) [32-34]. Tế bào hủy xương có vai trò phân hủy các mô xương cũ hỏng tạo lỗ hổng xương để cho các tế bào tạo xương thực hiện tái tạo mô xương mới, tế bào hủy xương tiết ra các enzym như protease để phân hủy thành phần hữu cơ và tiết ra ion H^+ tạo môi trường axit để phân giải thành phần vô cơ của mô xương [36].

1.3.4. Hoạt động mô hình xương (bone modeling) và tái tạo xương (bone remodeling)

Mô xương rất năng động, nó thay đổi trong suốt cuộc đời nhờ các quá trình tạo xương (bone modeling) và tái tạo xương (bone remodeling) (Hình 1.3) [38]. Mô hình xương xảy ra ưu thế trong độ tuổi thiếu nhi và thiếu niên khi tạo xương lấn át hủy xương, mật độ xương tăng, xương phát triển về kích thước và sức mạnh, mật độ xương đỉnh đạt được vào khoảng tuổi 25-30. Sau đó là quá trình tái tạo xương và xương bắt đầu bị hủy theo thời gian.

1.4. Loãng xương liên quan tái mô hình và các yếu tố liên quan

Tái tạo xương (bone remodeling) xảy ra ở bề mặt của các xương xốp và ở lớp nội màng của xương đặc (endocortical) hay còn gọi là nội màng của xương (endosteum). Quá trình tái tạo xương là quá trình hoạt động của tế bào tạo xương và tế bào hủy xương ở lớp nội màng (endosteum) nhằm mục đích duy trì sự chắc khỏe của xương bằng cách phân hủy các mô xương cũ hỏng và thay thế bằng các mô xương mới. Tuy nhiên, nếu tế bào hủy xương hoạt động mạnh hơn tế bào tạo xương thì sẽ dẫn đến bệnh loãng xương [20, 46].

1.5. Con đường RANKL/RANK/OPG và sự biệt hóa tế bào hủy xương

RANKL được giải phóng từ tiền tế bào tạo xương sẽ đến và gắn với thụ thể RANK trên bề mặt tiền tế bào hủy xương, sự gắn kết này đóng vai trò quan trọng trong sự biệt hóa tế bào hủy xương vì đó là sự bắt đầu kích hoạt một loạt các tín hiệu để biệt hóa tế bào hủy xương [54, 55]. Cụ thể, TRAF6 và các phiên mã c-Fos, NFATc1 là các yếu tố tiềm năng quan trọng trong sự biệt hóa tế bào hủy xương; TRAP và một

số gen khác như cathepsinK, DC-STAMP là các gen chỉ thị cho sự dung hợp nhân và chức năng của tế bào hủy xương.

1.6. Con đường OPG/RANK/RANKL và bệnh loãng xương

Loãng xương thường là hậu quả của hủy xương lấn át tạo xương do các nguyên nhân khác nhau. Các nguyên nhân trên đều liên quan đến con đường Rankl dẫn đến mất cân bằng giữa hủy xương và tạo xương, cụ thể chúng đều gây tăng RANKL, giảm OPG và làm tăng biệt hóa cũng như hoạt động của tế bào hủy xương làm loãng xương (tỉ lệ OPG /RANKL < 1 thì nguy cơ cao xảy ra loãng xương) [68, 69].

1.7. Các liệu pháp điều trị loãng xương

1.7.1. Tổng quan về các liệu pháp điều trị loãng xương

Các thuốc và liệu pháp để phòng chống và điều trị loãng xương đều hướng đến mục tiêu tăng tạo xương hoặc/và giảm hủy xương.

1.7.2. Thuốc chống loãng xương nhóm bisphosphonate, tác dụng và hiệu quả

Có hai nhóm bisphosphonate (BPs), nhóm thuốc thế hệ đầu chứa không chứa nitơ (non-N-BPs) (như etidronate, clodronate và tiludronate) và nhóm thuốc thế hệ sau có chứa nitơ (N-BPs) (như alendronate, ibandronate, zoledronate và risedronate). Hai loại BPs này có tác dụng khác nhau trên tế bào hủy xương, trong đó non-N-BPs gây chết tế bào hủy xương, còn N-BPs có tác dụng chủ yếu thông qua việc ức chế hoạt động của tế bào hủy xương [86].

1.8. Nghiên cứu về các hợp chất tự nhiên và tổng hợp có tiềm năng chống loãng xương

1.8.1. Tiềm năng chống loãng xương của resveratrol

Một số nghiên cứu đã cho thấy resveratrol làm tăng sự biệt hóa và hoạt động chức năng của tế bào tạo xương MC3T3-E1 của chuột [112, 113]. Đối với hủy xương, resveratrol ức chế sự biệt hóa của tế bào hủy xương ược kích hoạt bởi RANKL cả *in vitro* [109, 116, 117] và *in vivo* [116]. Trong nghiên cứu này chúng tôi lần đầu tiên đánh giá tác dụng bảo vệ xương của resveratrol trên mô hình cá Rankl.

1.8.2. Các chất NecroX và tiềm năng chống loãng xương của NecroX-5

Các chất NecroX có khả năng thâm qua màng và chống oxi hóa bảo vệ tế bào nhờ việc “dọn dẹp” các gốc tự do [124]. Vũ Thị Thu và cộng sự (2012) đã chứng minh NecroX-5 có tác dụng cải thiện tình trạng tổn thương tim và tế bào cơ tim chuột mô hình thiếu máu/tái tưới máu (Hypoxia/Reoxygenation -HR) nhờ khả năng ức chế sự mất cân bằng oxi hóa, làm giảm sự quá tải vận chuyển Ca^{2+} ở ti thể [132]. Nghiên cứu của Kim và cộng sự (2012) về NecroX₇ cho thấy có khả năng ức chế sự biệt hóa của tế bào hủy xương *in vitro* thông qua ức chế hoạt động của yếu tố NF-kB được kích hoạt bởi RANKL. Đây là những dữ liệu cơ sở gợi ý việc đánh giá tác dụng bảo vệ xương của NecroX-5 trong đề tài này.

1.9. Mô hình động vật dùng cho nghiên cứu về loãng xương

1.9.1. Động vật có vú dùng cho nghiên cứu về xương và bệnh loãng xương

Các nghiên cứu về xương và bệnh loãng xương thường được thực hiện trên các mô hình động vật động vật có vú như chuột, thỏ, chó, mèo, cừu, lợn, khỉ [144]. Với chi phí nuôi thấp và những ưu thế về đặc điểm sinh học không có ở động vật có vú, việc dùng cá làm mô hình là hướng tiếp cận mới cho thấy nhiều triển vọng. Mô hình cá có thể hỗ trợ, thay thế một phần đáng kể việc dùng các động vật có vú cho các nghiên cứu về xương [153].

1.9.2. Mô hình cá cho nghiên cứu về xương

1.10. Cá medaka làm mô hình cho các nghiên cứu về xương

1.10.1. Giới thiệu chung về cá medaka

Cá medaka (*Oryzias latipes*) là loài cá xương, sống tự nhiên trong môi trường nước ngọt, nước lợ ở các nước Đông Á và Đông Nam Á. . Cá có kích thước nhỏ (3-4cm), thời gian trưởng thành sinh dục ngắn (2 -3 tháng), dễ duy trì và chi phí nuôi thấp. Đặc biệt, phôi cá trong suốt cho phép quan sát và ghi lại hoạt động của các tế bào sống *in vivo* bằng kỹ thuật hình ảnh thường và huỳnh quang rất thuận tiện [158, 159]. Hiện nay, cá medaka đã được dùng để làm mô hình hầu hết các bệnh trên người, điều này đã được tổng kết ở rất nhiều bài báo tổng quan [160, 161].

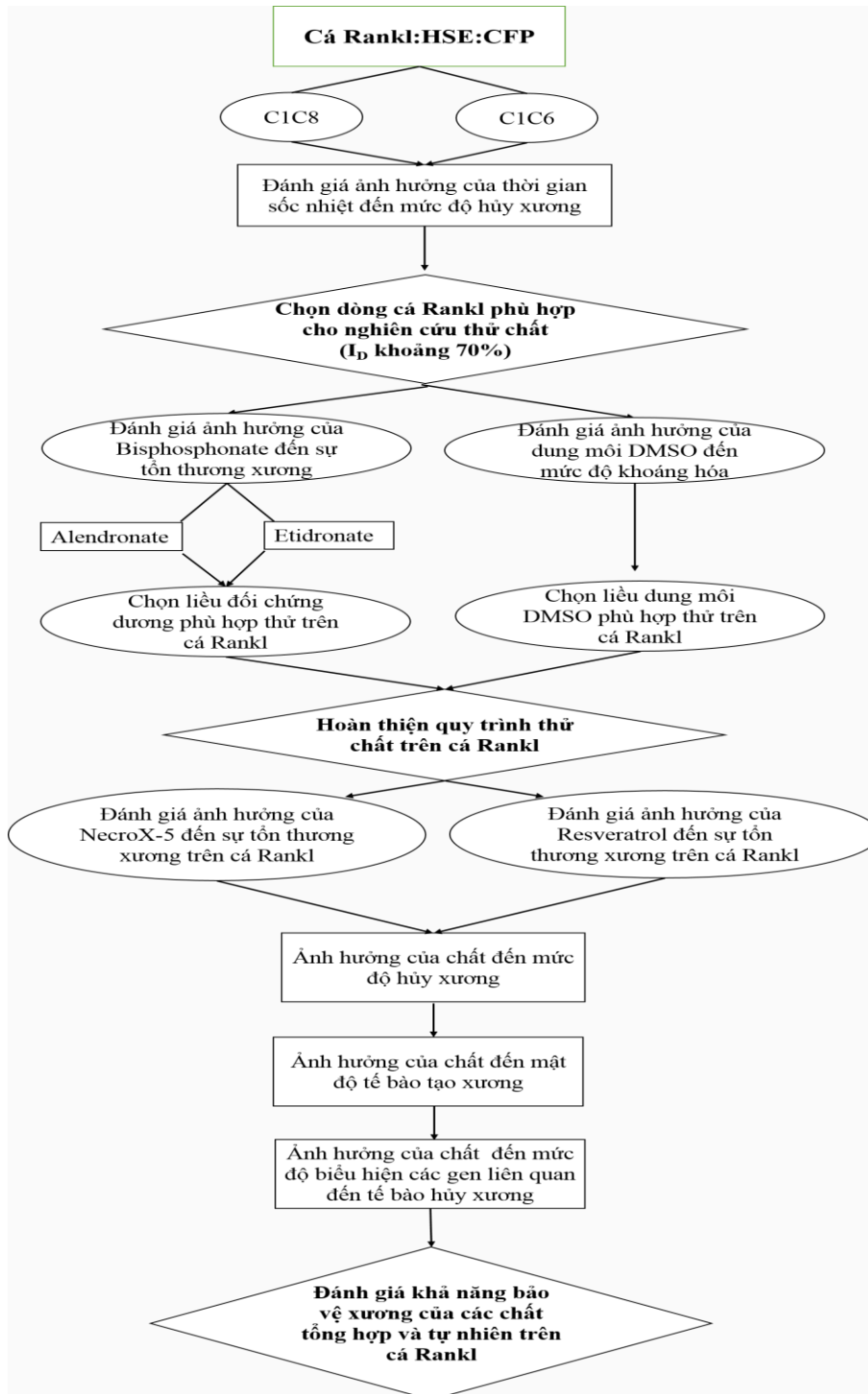
1.10.2. Tổng quan các nghiên cứu về xương trên cá medaka

Cá medaka đã và đang được dùng, ngày càng nhiều cho các nghiên cứu về xương và các bệnh xương [153, 154]. Diễn hình có thể kể đến vai trò của Rankl kích thích sự hình thành và hoạt động của tế bào hủy xương ngoại sinh, gây tổn thương xương và kiểu hình giống loãng xương ở cá chuyển gen *rankl:HSE:CFP* được tạo ra bởi Tô Thanh Thúy và cộng sự tại Đại học Quốc gia Singapo năm 2012 (xem thêm phần 1.10.3); ở mô hình cá này, tương tác giữa tế bào hủy xương và tạo xương được quan sát rất rõ *in vivo* theo thời gian thực trên cá sống [2].

1.10.3. Nghiên cứu sử dụng cá medaka chuyển gen *rankl:HSE:CFP* làm mô hình bệnh loãng xương

Kiểu hình giống loãng xương của cá *rankl:HSE:CFP* được tạo ra bằng cách làm tăng biểu hiện Rankl ngoại sinh nhờ cảm ứng nhiệt. So với các mô hình cá loãng xương tạo ra bằng cách khác, mô hình cá *rankl:HSE:CFP* có ưu thế vượt trội vì nó có thể đại diện cho các dạng loãng xương nguyên phát và thứ phát cũng như một số rối loạn thiếu xương (osteopenia) khác, vì kiểu hình loãng xương được gây ra bởi yếu tố kích thích hủy xương Rankl [175]. Tuy nhiên, một trong những vấn đề cần giải quyết để có thể sử dụng hiệu quả mô hình này là cần thiết lập được phương pháp để đánh giá mức độ khoáng hóa và tổn thương xương của cá.

CHƯƠNG II SƠ ĐỒ NGHIÊN CỨU



Hình 2.1. Sơ đồ quy trình nghiên cứu luận án

CHƯƠNG III

ĐỐI TƯỢNG, VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

3.1. Đối tượng nghiên cứu

Trong nghiên cứu này chúng tôi sử dụng cá medaka rankl:HSE:CFP, cá chủng đại và cá chuyển gen *collagen10a1:nlGFP* được cung cấp bởi Đại học Quốc gia Singapore.

3.2. Vật liệu, thiết bị, dụng cụ và hóa chất dùng trong nghiên cứu

3.2.1. Vật liệu (chất nghiên cứu) và dụng cụ thí nghiệm

* *Chất nghiên cứu*

- DMSO 100%: Kanto Chemical 10378 – 01 (Đối chứng dung môi)
- NecroXTM -5 (Sigma Aldrich -M0880-5G)
- Resveratrol (Viện Dược liệu TW) được chiết xuất từ cây cốt khí củ
- Alendronate (Sigma – A4978 - thuốc điều trị loãng xương)
- Etidronate (Sigma- P5248 - thuốc điều trị loãng xương)

* *Dụng cụ thí nghiệm*

Nghiên cứu của chúng tôi đã sử dụng các thiết bị gồm: hệ thống nuôi cá, đĩa nuôi phôi, đĩa thử chất, thiết bị làm tiêu bản chụp ảnh cá nhuộm cố định và cá nhuộm sống, thiết bị sàng lọc cá chuyển gen, thiết bị thí nghiệm sinh học phân tử

* *Hóa chất dùng trong nghiên cứu:*

Các hóa chất được dùng trong nghiên cứu gồm: hóa chất nhuộm cố định và nhuộm sống cá, chất gây mê cá, hóa chất tách ARN, tổng hợp cADN, hóa chất real time qPCR

3.3.1. Phương pháp nuôi và duy trì dòng cá medaka chuyển gen rankl:HSE:CFP

3.3.1.1. Ánh sáng, nhiệt độ, nước nuôi cá

Phương pháp nuôi được thực hiện theo quy chuẩn nuôi cá medaka và được cải tiến theo điều kiện phòng thí nghiệm. Cá được nuôi trong phòng thí nghiệm với chu kỳ sáng - tối là 14 giờ - 10 giờ, nhiệt độ phòng duy trì bằng điều hòa nhiệt độ đặt ở 28°C, dao động trong khoảng 26-30°C [1].

3.3.1.2. Thức ăn cho cá và cách cho cá ăn

Chúng tôi sử dụng thức ăn chuyên dùng cho cá medaka của hãng Hikari, Nhật Bản (<http://kyorin-net.co.jp/>), có nhiều loại thức ăn được dùng phù hợp cho theo từng giai đoạn phát triển của cá.

3.3.1.3. Phương pháp ghép cá đực và thu phôi cá

Đẻ cá đẻ đều thì cần phải duy trì điều kiện nuôi cá và nguồn thức ăn ổn định. Cá đực và cá cái được nuôi chung trong cùng một bể với số lượng từ 10-20 cá thể trưởng thành với tỷ lệ đực : cái là 1:2. Sau khi cá đẻ và quan sát trứng đã được thụ tinh, tiến hành thu trứng và cho vào dung dịch nước muối nuôi phôi và loại bỏ những trứng không được thụ tinh.

3.3.1.4. Phương pháp nuôi phôi và chăm sóc cá con

Phôi cá được nuôi trong đĩa petri với dung dịch nước muối nuôi cá nồng độ 60 mg/l. Sau 7-10 ngày tuổi, phôi nở thành ấu trùng cá, 5 ngày sau khi nở chuyển sang khay nuôi cá con và cho thức ăn của cá con. Cá con được nuôi trong nước lọc RO bổ sung muối biển và cho ăn 3 lần/ngày.

3.3.2. Phương pháp chọn dòng cá Rankl:HSE:CFP và thời gian sốc nhiệt đánh giá sốc nhiệt tạo kiểu hình loãng xương

Cá Rankl:HSE:CFP dòng c1c6, c1c8 và cá chủng đại (WT) đồng thời được thu phôi ở giai đoạn 0 ngày tuổi, sốc nhiệt ở 9 ngày tuổi, nhuộm xương ở 11 ngày tuổi để xác định chỉ số khoáng hóa I_M và chỉ số tổn thương xương I_D

3.3.3. Phương pháp đánh giá ảnh hưởng của bisphosphonate (Alendronate và Etidronate) đến sự tổn thương xương ở cá Rankl

Cá Rankl:HSE:CFP dòng c1c8 và cá chủng đại (WT) đồng thời được thu phôi ở giai đoạn 0 ngày tuổi, xử lý Bisphosphonate (Alendronate – 5; 12,5, 25, 50, 100 μ M và Etidronate 5;10;20;25;50) ở 7 ngày tuổi, sốc nhiệt ở 9 ngày tuổi và nhuộm xương ở 11 ngày tuổi để xác định chỉ số khoáng hóa I_M , chỉ số bảo vệ xương I_P .

3.3.4. Phương pháp đánh giá ảnh hưởng của DMSO đến mức độ khoáng hóa xương trên cá Rankl

Cá Rankl:HSE:CFP dòng c1c8 và cá chủng đại (WT) đồng thời được thu phôi ở giai đoạn 0 ngày tuổi, xử lý E3, Alendronate 25 μ g/ml và DMSO 0,1; 0,3; 0,5; 1; 2% ở 7 ngày tuổi, sốc nhiệt ở 9 ngày tuổi và nhuộm xương ở 11 ngày tuổi để xác định chỉ số khoáng hóa I_M , chỉ số bảo vệ xương I_P .

3.3.5. Phương pháp đánh giá khả năng bảo vệ xương của các chất tổng hợp và tự nhiên trên cá Rankl

3.3.5.1. Phương pháp pha chất NecroX-5 và Resveratrol dùng cho thí nghiệm

Các chất tự nhiên và tổng hợp được hòa tan trong DMSO 100% để tạo thành dung dịch gốc có nồng độ 100mM sau đó pha thành các stock của các nồng độ dùng cho thí nghiệm.

3.3.5.2. Phương pháp đánh giá khả năng bảo vệ xương của chất tổng hợp NecroX-5 trên cá Rankl

Cá Rankl:HSE:CFP dòng c1c8 và cá chủng đại (WT) đồng thời được thu phôi ở giai đoạn 0 ngày tuổi, xử lý DMSO 0,3%, Alendronate 25 μ g/ml và NecroX-5 50, 75, 100, 125, 150 và 200 μ M ở 7 ngày tuổi, sốc nhiệt ở 9 ngày tuổi và nhuộm xương ở 11 ngày tuổi để xác định chỉ số khoáng hóa I_M , chỉ số bảo vệ xương I_P .

3.3.5.3. Phương pháp đánh giá khả năng bảo vệ xương của chất tự nhiên Resveratrol trên cá Rankl

Cá *Rankl:HSE:CFP* dòng c1c8 và cá chủng dại (WT) đồng thời được thu phôi ở giai đoạn 0 ngày tuổi, xử lý DMSO 0,4%, và resveratrol 25, 50, 100, 150, 200 μ M ở 7 ngày tuổi, sốc nhiệt ở 9 ngày tuổi và nhuộm xương ở 11 ngày tuổi để xác định chỉ số khoáng hóa I_M , chỉ số bảo vệ xương I_P .

3.3.5.4. Phương pháp đánh giá ảnh hưởng của chất Resveratrol/ NecroX-5 đến tế bào tạo xương trên cá collagen10a1:nlGFP

Cá *collagen10a1:nlGFP* được thu phôi ở giai đoạn 0 ngày tuổi, xử lý DMSO 0,3%, và NecroX-5 125 μ M (đối với chất NecroX-5) hoặc DMSO 0,4% và resveratrol 150 μ M (đối với chất resveratrol) ở 7 ngày tuổi, thay môi trường ở 9 ngày tuổi và nhuộm sống với ALC ở 11 ngày tuổi để chụp ảnh huỳnh quang apotome xác định mật độ tín hiệu huỳnh quang chỉ thị cho tế bào tạo xương.

3.3.6. Phương pháp đánh giá ảnh hưởng của chất NecroX-5 đến sự biểu hiện các gen liên quan tế bào hủy xương (TRAF6, C-fos, NFATc1)

Các nhóm cá *Rankl* được thu phôi ở 0 ngày tuổi và nuôi trong dung dịch E3 trong tủ ấm, thử chất NecroX-5 125 μ M và DMSO 0,3% ở giai đoạn 7 ngày tuổi với mỗi lô đều có khoảng 10-11 cá, cá thử chất được sốc nhiệt 39°C trong 90 phút và thay môi trường ở giai đoạn 9 ngày tuổi để tăng hoạt động cũng như sự biệt hóa tế bào hủy xương. Các mẫu cá này ở giai đoạn 11 ngày tuổi được tách ARN bằng phương pháp dùng TRIzol (themofisher), sau đó các mẫu ARN được xử lý bằng DNase I theo phương pháp quy chuẩn (themofisher) và được tổng hợp cADN. Các mẫu cADN được dùng để thực hiện các phản ứng real time qPCR đánh giá mức độ biểu hiện của các gen cần nghiên cứu.

3.3.8. Phương pháp chụp ảnh và xử lý hình ảnh cá nhuộm Alizarin red

Phương pháp chụp ảnh huỳnh quang CFP: Tín hiệu huỳnh quang CFP được dùng làm chỉ thị cho gen chuyên *rankl:HSE:CFP* ở phôi cá chuyên gen. Phôi chuyên gen được sàng lọc nhờ tín hiệu CFP bằng kính soi huỳnh quang được lắp đặt với kính soi nổi Zeiss, ảnh được chụp nhờ máy ảnh Optika B3 và phần mềm Optika View7

Phương pháp chụp ảnh cá nhuộm xương: Ấu trùng cá đã nhuộm xương được đặt trên một lam kính có khoảng không gian (bề dày) được tạo ra bằng cách xếp chồng nhiều lamen ở hai bên (Hình 2.3) và chụp ảnh bằng máy ảnh Optika B3 nối với kính hiển vi Zeiss Axioplanz với độ phóng đại 2.5X và 10X.

3.3.9. Phương pháp đánh giá khoáng hóa

- Phương pháp đánh giá mức độ khoáng hóa xương cá và mức độ tổn thương xương

Mức độ khoáng hóa: $I_M = \sum_{k=1}^{15} L$ (I_M : tổng chiều dài cung xương đầu tiên, k: số thứ tự cung xương, L: chiều dài cung xương).

Mức độ tổn thương xương: $I_D = [I_M \text{ Trung bình nhóm WT} - I_M \text{ Trung bình nhóm rankl}] / I_M \text{ Trung bình WT} \times 100 \%$

Phương pháp này được xây dựng dựa trên cơ sở của phương pháp của Watson và cộng sự năm 2017 [4] và đã được thay đổi phù hợp với điều kiện nghiên cứu ở Việt Nam dưới sự trợ giúp của Tiến sỹ Trần Đức Long, Khoa Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội.

3.3.10. Phương pháp đánh giá hiệu quả bảo vệ của chất

Hiệu quả bảo vệ (I_p) của chất Resveratrol được tính bằng công thức:

$$I_p = \frac{IM(\text{Rankl} + \text{chất}) - IM(\text{Rankl} + \text{DMSO})}{IM(\text{WT} + \text{DMSO})} \%$$

3.3.11. Phương pháp nhuộm sống huỳnh quang

Cá collagen10a1:nlGFP được nhuộm với Alizarin complexon 0,02% trong 3,5 giờ, tránh ánh sáng. Sau đó rửa nhuộm bằng nước RO trong 1 giờ

3.3.12. Phương pháp chụp ảnh bằng kính apotome và xử lý hình ảnh, đo mật độ tế bào tạo xương bằng phần mềm ZEN

Cá collagen10a1:nlGFP sau khi được nhuộm sống huỳnh quang được gây mê trong Tricain 0,01% và được cố định bằng agarose low melting 1,5% để giữ cá không chuyển động. Sau đó, cá được chụp ảnh dưới kính hiển vi huỳnh quang Apotome. Ảnh chụp được xử lý, đo mật độ tế bào tạo xương bằng phần mềm ZEN

3.3.13. Phương pháp tách ARN và tổng hợp cADN

- Tách chiết ARN bằng Trizol (Theo phương pháp của themofisher)
- Tổng hợp cADN mẫu ARN đã tinh sạch (theo phương pháp của kit Themofisher)(https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/MAN0012716_RevertAid_FirstStrand_cDNA_Syn)

3.3.14. Phương pháp realtime-qPCR phân tích mức độ biểu hiện gen

Chênh lệch mức độ biểu hiện gen giữa nhóm đối chứng và thí nghiệm được phân tích theo phương pháp $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ của Livak [5].

3.3.15. Các cặp môi dùng cho phản ứng realtime-qPCR

Bảng 7. Các cặp môi sử dụng cho phản ứng realtime-qPCR

Tên môi	Trình tự môi xuôi (F)	Trình tự môi ngược (R)
β-actin	GAGCGCCGTCACACACAGC	GGATACTTCAGGGTCAGGATAACC
c-Fos	GCATGGGATCTCCTCAGTCTCAG	GAGCTCTCGCCTCCTGTTACG
NFATc1	CTCGTCTCTGCCAGCTCTGG	GGCTTCGTGGCTAGACGTGG
TRAF6	GCTGCATTGAGAAGTCCATCGTG	CGACAGTGGCGTGCTCCTC

3.3.16. Phương pháp xử lý thống kê số liệu

Phương pháp phân tích thống kê Kiểm định ANOVA được sử dụng để so sánh giá trị I_M trung bình của các nhóm cá thử chất. Kiểm định ANOVA và các đồ thị biểu diễn kết quả được thực hiện bằng phần mềm Graphad. Các số liệu được xử lý nhờ phương pháp Thomson để chọn các số liệu có giá trị nằm trong khoảng X Trung bình – S.T < I_m < X trung bình + S.T (S: độ lệch chuẩn; T giá trị Tau tương ứng với số mẫu) (*Outliers*, John M. Cimbala, Penn State University)

CHƯƠNG IV KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

4.1. Chọn dòng cá *rankl:HSE:CFP* và thời gian sốc nhiệt phù hợp cho nghiên cứu

* Thời gian sốc nhiệt và mức độ tổn thương xương của cá *Rankl* dòng *c1c6* và *c1c8*

Mức độ khoáng hóa xương của các nhóm cá thí nghiệm được xác định bằng phương pháp I_M (xem mục 3.3.9).

Trong các nhóm cá dòng *c1c6* bị sốc nhiệt, nhóm bị sốc nhiệt 120 phút có giá trị I_M thấp nhất (1110,5 px; n=24) và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với các nhóm 30 và 60 phút (nhóm 30 phút: 2130,7 px, n= 30, p<0.01; nhóm 60 phút: 1974,1 px, n =35, p<0.05. Đối với các nhóm cá dòng *c1c8* nhóm 120 phút cũng có giá trị I_M thấp nhất (489,8 px, n=20) và khác biệt có ý nghĩa thống kê với các nhóm còn lại (nhóm 30 phút: 2003,6 px, n=21, p< 0,001. Nhìn chung chỉ số khoáng hóa trung bình của các nhóm cá giảm khi tăng thời gian sốc nhiệt.

Mức độ tổn thương xương tăng khi tăng thời gian sốc nhiệt, tuy nhiên không tăng tuyến tính. Mức độ này thấp nhất khi cá bị sốc nhiệt trong thời gian 30 phút (I_D của dòng *c1c6* và *c1c8* tương ứng là 38,9% và 42,5%), tăng lên khi sốc nhiệt 60 phút (43,4% và 63,7%), 90 phút (49,4% và 76,1%) và cao nhất khi sốc nhiệt 120 phút

(68,1 % và 85,9%). Số liệu cũng cho thấy, ở cùng một thời gian sốc nhiệt, cá dòng c1c6 luôn có mức độ tổn thương xương thấp hơn so với cá dòng c1c8. Thêm vào đó, nghiên cứu của Phạm Văn Cường năm 2021 cho thấy, mức độ tổn thương xương ở cá Rank1 thích hợp để đánh giá hoạt tính của chất là khoảng 70% [93]. Do vậy những kết quả thu được ở phần thí nghiệm này gợi ý chúng tôi chọn dùng cá Rank1 dòng c1c8 với qui trình thí nghiệm có thời gian sốc nhiệt ở 39°C là 90 phút khi cá 9 ngày tuổi, thời gian phân tích kiểu hình xương là 11 ngày tuổi, hai ngày sau sốc nhiệt cho các thí nghiệm tiếp theo đánh giá hoạt tính bảo vệ xương của các chất (xem thêm phần bàn luận mục 5.3). Từ đây, cá *rank1:HSE:CFP* dòng c1c8 được gọi ngắn gọn là cá Rank1.

4.2. Ảnh hưởng của bisphosphonate đến sự tổn thương xương ở cá Rank1

4.2.1. Ảnh hưởng của alendronate đến sự tổn thương xương trên cá Rank1

Mỗi đợt thí nghiệm được thực hiện trên bốn nhóm cá bao gồm: nhóm cá Rank1 được xử lý với alendronate ở một trong năm nồng độ (+Rank1+Alen5/12,5/25/50/100), nhóm Rank1 không được xử lý với alendronate (+Rank1-Alen5/12,5/25/50/100); thêm vào đó, hai nhóm cá chứng đại được xử lý (WT+ Alen5/12,5/25/50/100) và không được xử lý với alendronate (WT-Alen5/12,5/25/50/100) cũng được đưa vào thí nghiệm để đối chứng cho tác dụng của chất này đến sự phát triển bình thường của xương.

Trong khi giá trị I_M của các nhóm cá chứng đại được xử lý và không được xử lý với alendronate không có sự khác biệt đáng kể ($p > 0.05$) thì giá trị này ở nhóm cá Rank1 được xử lý với alendronate ở tất cả các liều đều cao hơn so với nhóm cá đối chứng tương ứng không được xử lý alendronate, điều này cũng có nghĩa là mức độ tổn thương xương của các nhóm cá được xử lý với alendronate thấp hơn so với cá đối chứng. Khác biệt có ý nghĩa thống kê được thấy giữa các giá trị I_M của mỗi nhóm cá được xử lý với alendronate ở một trong các nồng độ 25, 50 và 100 $\mu\text{g/ml}$ so với nhóm cá đối chứng tương ứng (lần lượt là 1691,58 px so với 1205,59 px ($p < 0,05$), 1648,55 px so với 855,785 px ($p < 0,01$); 1686,35 px so với 1043,61 px ($p < 0,01$). Chỉ số bảo vệ xương I_p của alendronate ở các liều này tính được (xem công thức mục 3.3.8) tương ứng là 19,3; 31,5 và 25.5% .

4.2.2. Ảnh hưởng của etidronate đến sự tổn thương xương trên cá Rank1

Etidronate được thử nghiệm ở các nồng độ 5; 10; 20; 25; 50 $\mu\text{g/ml}$ trong đó các liều 5; 10; 20; 25 $\mu\text{g/ml}$ (+Rank1+Eti5/10/20/25) được thực hiện trong cùng một đợt, sử dụng cùng nhóm đối chứng dung môi (cá Rank1 không được xử lý với etidronate (+Rank1-Eti) và chứng đại (WT-Eti), (WT+Eti5/10/20/25); liều 50 $\mu\text{g/ml}$ được thực hiện trong một đợt thí nghiệm khác (các nhóm cá của đợt thí nghiệm này gồm +Rank1+Eti50, +Rank1-Eti50, WT+Eti50, WT-Eti50).

So sánh thống kê chỉ số I_M của các nhóm cá cho thấy các nhóm cá được xử lý với etidronate ở các liều 5,10 và 20 $\mu\text{g/ml}$ có chỉ số I_M cao hơn các cá đối chứng không được xử lý với etidronate (giá trị I_M tương ứng của các nhóm này là 743,8 px; $n=21$, $p<0,001$; 666,74 px, $n=17$; $p<0,01$; 1299,1 px, $n=18$, $p<0,0001$, so với 422,4 px. Chỉ số bảo vệ xương của các etidronate ở các liều này tính được tương ứng là 10,1; 7,7; 27,4 %.

Kết quả của chúng tôi phù hợp với kết quả nghiên cứu trước đây khi đánh giá mức độ giảm tổn thương xương bằng hình ảnh huỳnh quang trên cá sống [180]. Từ kết quả này, cùng với điều kiện phòng thí nghiệm, chúng tôi chọn alendronate nồng độ 25 $\mu\text{g/ml}$ làm đối chứng dương cho các thí nghiệm đánh giá tác dụng của các chất được khảo sát trong đề tài.

4.2.3. Ảnh hưởng của DMSO đến mức độ khoáng hóa xương trên cá Rankl

DMSO là dung môi hữu cơ chứa lưu huỳnh có thể hòa tan được cả hợp chất phân cực và không phân cực nên được sử dụng rộng rãi làm dung môi cho các nghiên cứu đánh giá hoạt tính của các chất [181]. Đặc biệt, DMSO có tác dụng ức chế tế bào hủy xương và làm giảm sự mất xương ở động vật mô hình bệnh loãng xương [183]. Trong nghiên cứu này, chúng tôi cần dùng DMSO làm dung môi hòa tan các chất (xem thêm ở mục 6.1), do vậy ảnh hưởng của DMSO đến sự tổn thương xương cá Rankl cần được khảo sát để cung cấp dữ liệu cho các nghiên cứu trên cá nói chung cũng như để tìm ra nồng độ DMSO thích hợp, hoàn thiện qui trình sử dụng cá cho nghiên cứu này.

Các nhóm cá trong thí nghiệm bao gồm cá Rankl được xử lý với DMSO ở các nồng độ 0,1; 0,3; 0,5; 1 và 2% so sánh với nhóm đối chứng là cá Rankl được nuôi trong môi trường E3 không có DMSO; nhóm đối chứng dương có cá Rankl được nuôi trong môi trường E3 có alendronate với nồng độ 25 $\mu\text{g/ml}$; một nhóm cá chủng đại được nuôi trong môi trường E3 làm đối chứng cho sự phát triển bình thường của cá.

Các nhóm cá được xử lý bởi DMSO đều có xương cung thần kinh ít bị tổn thương hơn cũng như có giá trị của chỉ số khoáng hóa trung bình I_M (cụ thể I_M là 742,9; 912,5; 1179,2; 1851,9; 2565,5; (px) tương ứng với các nhóm DMSO 0,1; 0,3; 0,5; 1; 2%;) cao hơn nhóm đối chứng E3 ($I_M=577,7$ (px)). Tuy nhiên chỉ có các nhóm cá được xử lý với DMSO ở các nồng độ 0,5, 1 và 2% mới có chỉ số I_M cao hơn nhóm đối chứng E3 có ý nghĩa thống kê (lần lượt có $p<0,01$, $p<0,001$, $p<0,001$). Như vậy DMSO có tác dụng bảo vệ xương cá Rankl ở các nồng độ cao (nồng độ 1 và 2% cho chỉ số bảo vệ I_P tương ứng là 36,7 và 57,3% so với I_P của alendronate 25 $\mu\text{g/ml}$ là 25%). Như vậy nghiên cứu của chúng tôi lần đầu tiên làm trên cá medaka Rankl đã cho kết quả phù hợp với kết quả của một số nghiên cứu trước đây thực hiện trên mô hình tế bào và động vật mô hình bệnh loãng xương về tác dụng bảo vệ xương của

DMSO [183]. Điều này khuyến cáo các nghiên cứu đánh giá tác dụng bảo vệ xương của các chất khác trên cá Rankl khi phải dùng DMSO như dung môi chỉ nên dùng ở nồng độ thấp, thấp hơn 0,5% để tránh ảnh hưởng của DMSO đến kết quả nghiên cứu.

4.3. Đánh giá khả năng bảo vệ xương của các chất tổng hợp và tự nhiên trên cá Rankl

4.3.1. Ảnh hưởng của chất tự nhiên resveratrol đến sự tổn thương xương trên cá Rankl

4.3.1.1. Resveratrol có làm giảm mức độ tổn thương xương trên cá Rankl

Tác dụng của chất tự nhiên resveratrol được đánh giá trên cá Rankl ở các nồng độ 25, 50, 100, 150 và 200 μ M, đối chứng dung môi là DMSO 0,4%. Giá trị chỉ số khoáng hóa trung bình I_M của các nhóm cá Rankl được xử lý với resveratrol 25, 50, 100, 150 và 200 μ M tương ứng là 2147,6 pixel, n=40; 2059,7 pixel, n =44; 2210,4 pixel, n=43; 2286,4 pixel, n=40; 2146,5 pixel, n= 33 cao hơn có ý nghĩa thống kê so với nhóm đối chứng ($I_M= 1531,5$; n= 57) với p tương ứng là $p<0,01$; $p<0,05$; $p<0,001$; $p<0,001$; $p<0,01$ (Hình 4.10 A). Điều thú vị là chúng tôi không thấy được tác dụng theo liều rõ rệt của resveratrol trên mô hình cá này, vì các giá trị I_M của các nhóm cá được xử lý với resveratrol ở các liều đều không có sự khác biệt đáng kể ($p>0,05$). Chỉ số bảo vệ xương của các liều resveratrol tính được là 16,9; 14,5; 18,6; 20,7; 16,9 %. Chúng tôi tiếp tục đánh giá ảnh hưởng của resveratrol đến tế bào hủy xương và sự khoáng hóa của cá, sử dụng liều 150 μ M.

4.3.1.2. Resveratrol không ảnh hưởng đến tế bào tạo xương và mức độ khoáng hóa của cá *coll10a1:nlGFP*

Resveratrol ở nồng độ 150 μ M không ảnh hưởng đến mức độ biểu hiện gen *collagen10a1* và tế bào tạo xương biểu hiện *collagen10a1* cũng như không ảnh hưởng đến mức độ khoáng hóa xương của cá. Điều này không đồng nhất với một số nghiên cứu trên tế bào và trên động vật khác cho thấy resveratrol có tác dụng kích thích kích thích tạo xương và biệt hóa của các tế bào tạo xương [116]. Sự khác biệt này có thể do thiết kế nghiên cứu của chúng tôi không tương đồng với các nghiên cứu trên các mô hình khác và do phạm vi hạn chế của đề tài chúng tôi cũng chưa phân tích thêm được những loại tế bào tạo xương biểu hiện những marker tạo xương khác. Như vậy, với thiết kế thí nghiệm của chúng tôi, mới chúng tỏ được resveratrol có tác dụng bảo vệ xương theo hướng làm giảm tổn thương xương gây ra bởi Rankl trên cá *rankl:HSE:CFP* mô hình bệnh loãng xương.

4.3.2. Ảnh hưởng của chất tổng hợp NecroX-5 đến sự tổn thương xương trên cá Rankl

4.3.2.1. NecroX-5 làm giảm mức độ tổn thương xương của cá Rankl

Phôi cá Rankl 7 ngày tuổi được chia thành các nhóm và nuôi trong môi trường có NecroX-5 ở các nồng độ 50, 100, 125, 150 và 200 μ M hòa tan trong DMSO 0,3% (+Rankl+ DMSO+NecX) hay môi trường chỉ có DMSO 0,3% (đối chứng dung môi (+Rankl+DMSO) hoặc môi trường có alendronate 25 μ g/ml và 0,3% DMSO (đối

chúng dương (+Rankl+ DMSO+ Alen); một nhóm cá chủng đại cùng ngày tuổi được nuôi trong môi trường có 0,3% DMSO để làm đối chứng về sự phát triển bình thường của xương (WT (-Rankl)).

Giá trị I_M của các nhóm cá được xử lý với NecroX-5 ở các nồng độ 50; 100 và 125 μM và nhóm alendronate 25 $\mu\text{g/ml}$ cao hơn có ý nghĩa thống kê so với nhóm đối chứng DMSO (I_M của các nhóm (+Rankl+NecX) này tương ứng là 1167,9; n= 33; 1158,2; n= 40; 1459,7; n=47; của nhóm (+Rankl+ Alen) là 1459,7 pixel; n = 51 so với nhóm đối chứng (+Rankl-NecX hay DMSO) là 712,2; n = 48 với p tương ứng <0,05; 0,05; 0,001; 0,001). Trong đó, nhóm cá xử lý với NecroX ở nồng độ 125 μM có trị số I_M cao nhất, bằng với trị số này của nhóm đối chứng dương khi cá được xử lý với thuốc chống loãng xương alendronate 25 $\mu\text{g/ml}$. Như vậy, NecroX có tác dụng bảo vệ xương (ở các nồng độ 50; 100 và 125 μM) theo hướng làm giảm tổn thương xương gây ra bởi tăng Rankl ngoại sinh trên cá Rankl mô hình bệnh loãng xương. Chỉ số bảo vệ xương của NecroX5 ở các nồng độ này tính được tương ứng là 12,5; 12,2; 20,5% . Một chất có tác dụng bảo vệ xương có thể thể hiện theo hai hướng, làm giảm hủy xương hoặc/và làm tăng tạo xương. Do vậy, tiếp theo, chúng tôi tìm hiểu ảnh hưởng của NecroX-5 đến tạo xương và phân tích tác dụng bảo vệ xương của NecroX5 ở mức độ tế bào và phân tử. Nồng độ NecroX5 có tác dụng bảo vệ xương cao nhất là 125 μM được chọn cho các thí nghiệm này.

4.3.2.2. Ảnh hưởng của NecroX-5 đến mức độ biểu hiện một số gen chức năng của tế bào hủy xương trên cá Rankl

Kết quả nghiên cứu ở phần trên đã cho thấy NecroX-5 có tác dụng làm giảm tổn thương xương hay làm giảm mức độ xương bị hủy gây ra bởi Rankl trên cá *rankl:HSE:CFP* mô hình bệnh loãng xương. Tiếp theo, chúng tôi muốn bước đầu tìm hiểu tác dụng này của chất ở mức độ phân tử, do vậy chúng tôi kiểm tra ảnh hưởng của nó với con đường truyền tín hiệu Rankl/Rank giúp biệt hóa và hoạt hóa tế bào hủy xương (xem thêm phần tổng quan mục 1.3.4). Cụ thể, biểu hiện của một số gen mã hóa cho một số yếu tố chính tham gia vào con đường truyền tín hiệu này bao gồm gen TRAF6, NFATc1, C- Fos [67] được phân tích bằng phương pháp realtime RT-PCR (RT-qPCR) định lượng tương đối. Thí nghiệm thực hiện trên hai nhóm cá Rankl được nuôi trong môi trường có NecroX-5 nồng độ 125 μM với 0,3 % DMSO (nhóm thí nghiệm) hay nuôi trong môi trường chỉ có 0,3 % DMSO (nhóm đối chứng) từ 7-11 ngày tuổi.

RNA tổng số của mỗi nhóm cá 11 ngày tuổi được tách từ 11 cá thể, sau đó cDNA được tổng hợp để làm khuôn mẫu cho phản ứng realtime PCR (qPCR) định lượng, sử dụng mastermix có chứa SYRBER GREEN.

4.3.2.2.1 Kết quả tách ARN và tổng hợp cADN từ các nhóm cá thí nghiệm

Kết quả cho mẫu ARN của cá nhóm xử lý với NecroX-5 và nhóm đối chứng có nồng độ tương ứng là 530 và 550 $\mu\text{g}/\text{mL}$ với chỉ số đo OD A260/280 cùng là 1,91; chỉ số A260/A230 tương ứng là 2,17 và 1,98. Các chỉ số này cho thấy ARN của hai mẫu tách được đảm bảo yêu cầu về độ tinh sạch, không bị nhiễm protein, muối hay các tạp chất [184], có thể sử dụng để tổng hợp cDNA.

Chúng tôi tiếp tục tổng hợp cADN từ hai mẫu ARN tách được sử dụng bộ Kit tổng hợp cADN của Themofisher. Các phản ứng PCR có khuôn là cDNA đều cho các sản phẩm khuếch đại tương ứng với các đoạn gen và mỗi đã được thiết kế có kích thước khoảng 300 bp (trong khi phản ứng không có khuôn (thay cDNA bằng nước (H₂O) không có sản phẩm nào được khuếch đại, chứng tỏ các sản phẩm PCR được khuếch đại từ cDNA chứ không phải từ DNA bị nhiễm trong nước).

4.3.2.2.2. *Kết quả kiểm tra độ chính xác và hiệu suất của các phản ứng real time PCR*

Chênh lệch về mức độ biểu hiện của mỗi gen được phân tích giữa hai nhóm cá xử lý NecroX và nhóm đối chứng DMSO được tính theo công thức của Livak dựa trên các giá trị Ct của phản ứng real time PCR (qPCR) khuếch đại gen này và gen nội chuẩn beta actin từ hai mẫu cDNA của hai nhóm cá (xem phần phương pháp mục 3.3.14). Để đảm bảo các phản ứng qPCR là chính xác và có hiệu suất xấp xỉ 100%, chúng tôi đã thực hiện các phản ứng qPCR với từng cặp mỗi sử dụng khuôn là cADN được pha loãng tăng dần theo tỉ lệ 1, 1/2, 1/4, 1/8 và kiểm tra giá trị Ct của các phản ứng này. Giá trị Ct của các phản ứng qPCR khuếch đại gen beta actin từ các mẫu cADN theo dải pha loãng 1, 1/2, 1/4, 1/8 cách nhau tương ứng xấp xỉ khoảng 1 chu kỳ, độ dốc (Slope) của cả hai đường biểu diễn mối quan hệ giữa nồng độ cADN và giá trị Ct của mẫu DMSO và NecroX đều là khoảng (-3,4). Từ đó chúng tôi tính được hiệu suất PCR cả hai mẫu khoảng 96% ~ 100%.

Nhiệt độ nóng chảy (Melt curve) (T_m) của sản phẩm qPCR khuếch đại từ các mẫu cADN của cá được xử lý DMSO (Hình A) và NecroX-5 (Hình B) với mỗi β -actin, TRAF6, NFATc1, C-Fos khoảng 81 – 84^oC

Các kết quả trên đã khẳng định chất lượng cDNA, độ chính xác, đặc hiệu và hiệu suất của phản ứng qPCR là phù hợp để tiếp tục đánh giá biểu hiện gen của hai nhóm cá thí nghiệm.

4.3.2.2.3. *Kết quả so sánh mức độ biểu hiện của các gen TRAF6, NFATc1, C-Fos, của cá được xử lý NecroX-5 so với đối chứng DMSO.*

NecroX5 đã làm giảm biểu hiện của gen c-Fos 3,8 lần và giảm biểu hiện gen NFATc1 khoảng 2,8 lần trong khi hầu như không ảnh hưởng đến sự biểu hiện của gen TRAF6 so với nhóm đối chứng. Kết quả này gợi ý NecroX5 ức chế con đường truyền tín hiệu RANKL gây biệt hóa và hoạt động chức năng của tế bào hủy xương,

qua đó làm ức chế hủy xương, làm giảm tổn thương xương trên cá Rankl (xem thêm phần bàn luận mục 5.4).

4.3.2.3. NecroX-5 làm tăng biểu hiện biểu hiện collagen10a1 của tế bào tạo xương và mức độ khoáng hóa của cá col10a1:nlGFP

Hai nhóm phôi cá *col10a1:nlGFP* 7 ngày tuổi được xử lý, nuôi trong môi trường có NecroX-5 ở nồng độ 125 μM (nhóm thí nghiệm) hay chỉ nuôi trong môi trường có 3% DMSO (nhóm đối chứng), đến 11 ngày tuổi, cá được nhuộm xương bằng ALC, sau đó được gây mê, cố định và chụp ảnh bằng kính hiển vi huỳnh quang Apotome. Tế bào tạo xương và mức độ khoáng hóa của cá sống được phân tích đại diện trên 7 đốt sống (từ đốt số 6 đến đốt 12) thông qua tín hiệu huỳnh quang GFP và ALC. Mật độ tín hiệu huỳnh quang GFP và ALC trung bình ở nhóm cá xử lý với NecroX-5 đều cao hơn nhóm cá đối chứng (GFP: $4,2 \times 10^7$ so với $2,4 \times 10^7$ ($p < 0,05$); ALC: $1,3 \times 10^7$ so với $0,67 \times 10^7$ ($p < 0,05$)). Việc tăng mật độ tín hiệu GFP ở cá này là chỉ dấu cho sự tăng biểu hiện gen *col10a1* của mỗi tế bào hoặc/và tăng số lượng/ mật độ tế bào tạo xương [158]. Như vậy có thể nói NecroX-5 nồng độ 125 μM làm tăng mức độ khoáng hóa xương của cá, có thể do làm tăng biểu hiện *collagen10a1* và tăng mật độ tế bào tạo xương biểu hiện *collagen10a1* ở cá chuyển gen *col10a1:nlGFP*.

CHƯƠNG V. BÀN LUẬN

5.1. Alendronate và etidronate có tác dụng bảo vệ xương cá medaka khỏi tổn thương gây ra bởi Rankl và có thể được dùng như đối chứng dương cho các thử nghiệm đánh giá tác dụng của hoạt chất trên cá

Tác dụng của hai chất này thể hiện theo liều, alendronate có tác dụng bảo vệ xương ở các nồng độ 25, 50, 100 $\mu\text{g/ml}$ (cho chỉ số bảo vệ xương I_p tương ứng là 19,3, 31,5 và 25,5%) và etidronate ở các nồng độ 5, 10, 20 $\mu\text{g/ml}$ (cho chỉ số bảo vệ xương I_p tương ứng là 10,1; 7,7 và 27,4 %).

Từ những kết quả về tác dụng làm giảm tổn thương xương của hai bisphosphonate trên mô hình cá loãng xương *rankl:HSE:CFP*, chúng tôi có thể chọn hai chất này làm đối chứng dương cho các nghiên cứu tiếp theo đánh giá tác dụng bảo vệ xương của các chất. Tuy nhiên, vì sự phổ biến và giá thành thấp hơn của alendronate, chúng tôi chọn chất này làm đối chứng dương. Với điều kiện của đề tài, nồng độ alendronate thấp nhất có tác dụng là 25 $\mu\text{g/ml}$ được chọn cho các nghiên cứu về NecroX-5 và resveratrol tiếp theo. Tổng kết lại, với những kết quả thu được từ thí nghiệm đánh giá tác dụng của alendronate và etidronate trên cá *rankl:HSE:CFP* mô hình bệnh loãng xương, chúng tôi đã khẳng định được sự tương đồng của mô hình cá này với người về tác dụng bảo vệ, làm giảm tổn thương xương của các thuốc chống

loãng xương nhóm bisphosphonate. Alendronate được chọn làm đối chứng dương cho các nghiên cứu đánh giá hoạt tính của các chất ở nồng độ 25µg/ml.

5.2. DMSO có thể ảnh hưởng đến mức độ tổn thương xương trên cá Rankl, sử dụng DMSO làm dung môi cần chú ý đến nồng độ

DMSO (Dimethyl sulfoxide) là một dung môi hữu cơ lưỡng cực nên có thể hòa tan cả chất phân cực và không phân cực [195]. Dung môi này do vậy được dùng rất rộng rãi trong các nghiên cứu y sinh, đặc biệt để hòa tan các chất không tan trong nước.

Tác dụng theo liều của DMSO với chuyển hóa xương còn được thể hiện rõ trong nghiên cứu của Cheung và cộng thực hiện trên tế bào tạo xương. Ở nồng độ thấp (dưới 0,5% (v/v)), DMSO không có ảnh hưởng đến sự tăng sinh của tiền tế bào tạo xương MC3T3-E1 nhưng nồng độ cao (1%(v/v)) có thể làm giảm sự tăng sinh; nồng độ 0,5 và 1% (v/v) làm tăng sự biệt hóa của các tế bào này thành tế bào tạo xương thông qua việc làm tăng biểu hiện của các gen runx2 và osterix cũng như làm tăng hoạt động khoáng hóa của chúng [200].

Nghiên cứu của chúng tôi cho thấy việc dùng DMSO làm dung môi có thể ảnh hưởng hay không ảnh hưởng đến kết quả nghiên cứu về xương trên cá medaka Rankl, tùy thuộc vào liều DMSO được dùng. Để đảm bảo DMSO không ảnh hưởng đến kết quả đánh giá tác dụng làm giảm tổn thương xương của các chất trên các dòng cá này, nồng độ DMSO được dùng cần nhỏ hơn 0,5%.

5.3. Nghiên cứu đã tìm ra dòng cá và xác định được thời gian sốc nhiệt phù hợp, hoàn thiện qui trình sử dụng cá *rankl:HSE:CFP* để đánh giá tác dụng bảo vệ xương của các chất

Nghiên cứu của Phạm Văn Cường và nhóm chúng tôi đã công bố trước đây cho thấy mức độ tổn thương xương cá phù hợp cho nghiên cứu đánh giá tác dụng của chất là khoảng 70% [93]; như vậy có thể sử dụng cá c1c6 với thời gian sốc nhiệt là 120 phút hay dòng c1c8 với thời gian sốc nhiệt 90 phút. Dựa vào điều này, cùng với điều kiện hiện có của phòng thí nghiệm về các dòng cá, chúng tôi đã chọn sử dụng dòng cá Rankl c1c8 với thời gian sốc nhiệt là 90 phút cho các nghiên cứu tiếp theo để rút ngắn qui trình thí nghiệm cũng như tránh được ảnh hưởng của sốc nhiệt kéo dài với sự phát triển chung của cá.

Tổng hợp kết quả với phần đánh giá tác dụng của DMSO, chúng tôi đã tìm ra một số yếu tố để hoàn thiện qui trình nghiên cứu cho thí nghiệm đánh giá hoạt tính các chất là sử dụng cá *rankl:HSE:CFP* dòng c1c8, sốc nhiệt 39°C khi cá 9 ngày tuổi trong 90 phút và phân tích kiểu hình xương cá khi cá 11 ngày tuổi, hai ngày sau sốc nhiệt; nồng độ DMSO dùng để hòa tan chất thử nghiệm ở môi trường xử lý cá không quá 0,5%.

5.4. NecroX5 có tác dụng bảo vệ xương cá theo hướng ức chế hủy xương và kích thích tạo xương

Nghiên cứu của chúng tôi là nghiên cứu đầu tiên đánh giá khả năng bảo vệ xương theo hướng ức chế hủy xương của NecroX5 ở mức độ *in vivo* trên mô hình cá medaka loãng xương gây bởi Rankl ngoại sinh. Tác dụng của chất theo hướng kích thích tạo xương cũng được đánh giá trên mô hình cá chuyển gen biểu hiện *collagen10a1* ở tế bào tạo xương.

NecroX-5 125 μ M có hiệu quả bảo vệ xương tốt nhất là 20,4 % (xem phần kết quả mục 4.3.2.1), tương đương với tác dụng của thuốc chống loãng xương alendronate ở nồng độ 25 μ g/ml. Vì sự tổn thương xương của cá mô hình được gây ra bởi sự tăng cường Rankl, chúng tôi đã tiếp tục đánh giá ở mức độ phân tử tác dụng của chất này bằng cách phân tích biểu hiện các gen mã hóa cho các yếu tố tham gia vào con đường truyền tín hiệu Rankl/Rank ở cá Rankl được xử lý và không được xử lý với NecroX 125 μ M. Với điều kiện hạn chế trong phạm vi đề tài, chúng tôi chỉ mới đánh giá bước đầu biểu hiện của ba gen là TRAF6, NFATc1, C-Fos bằng kỹ thuật real time hay qPCR. NecroX làm giảm biểu hiện của c-Fos và NFATc1. RANKL được biết là có thể kích hoạt nhiều con đường tín hiệu trong tế bào, qua đó dẫn đến sự hoạt hóa của c-Fos và sau đó là NFATc1 [204]. Một trong những con đường được kích hoạt bởi RANKL dẫn đến hoạt hóa NFATc1 đáng chú ý là con đường tạo ra các gốc tự do ROS được nhiều nghiên cứu nói đến [205] và được Kim và cộng sự đề xuất mô hình dựa trên kết quả nghiên cứu trên chuột [142].

Về ảnh hưởng của NecroX theo hướng tạo xương, khác với resveratrol, NecroX5 có tác dụng kích thích tạo xương, làm tăng sự biểu hiện gen *collagen10a1* hoặc/và mật độ và số lượng của tế bào tạo xương biểu hiện gen này cũng như làm tăng mức độ khoáng hóa của cá.

Tổng kết lại, kết quả của chúng tôi đã cho thấy NecroX5 có tác dụng bảo vệ xương cá medaka theo hướng ức chế hủy xương gây ra do Rankl và kích thích tạo xương, hứa hẹn tiềm năng cho nghiên cứu phát triển chất này thành thuốc chống loãng xương.

5.5. Resveratrol có tác dụng bảo vệ xương cá khỏi tổn thương gây ra bởi Rankl

Do resveratrol có tính chống oxi hóa cao và các gốc tự do được biết đến có thể được sinh ra trong con đường truyền tín hiệu Rankl/Rank tham gia vào quá trình hình thành và biệt hóa của tế bào hủy xương [142, 210, 211] nên chất cũng có thể có tác dụng ức chế hủy xương bằng cách “dọn dẹp” các gốc tự do.

Chúng tôi cũng đã bước đầu tìm hiểu tác dụng của RES đối với sự tạo xương trên cá medaka. RES ở nồng độ 150 μ M không có tác dụng đến biểu hiện gen

collagen10a1, một gen biểu hiện ở giai đoạn rất sớm trong quá trình biệt hóa của tế bào tạo xương cũng như số lượng và mật độ tế bào của các tiền tế bào tạo xương biểu hiện gen này [158]. RES cũng không ảnh hưởng đến mức độ khoáng hóa của xương cá thể hiện gián tiếp thông qua tín hiệu huỳnh quang đỏ ALC trong thiết kế thí nghiệm này. Tuy nhiên, chúng tôi cần có những nghiên cứu với thiết kế thí nghiệm đánh giá tác dụng của RES theo hướng kích thích tạo xương ở khoảng thời gian phát triển khác của cá cũng như phân tích biểu hiện của một số gen khác đặc hiệu cho các giai đoạn biệt hóa và hoạt động chức năng của tế bào tạo xương như *twist* [165], *osterix* [159], *osteocalcin* [213], *alkaline phosphatase* [214] với một số nồng độ RES cao hơn mà phạm vi nghiên cứu này không cho phép để khẳng định được tác dụng theo hướng tạo xương của chất này trên cá.

Tổng kết lại, điều quan trọng là kết quả của chúng tôi đã xác định được resveratrol ở năm nồng độ nghiên cứu đều có tác dụng ức chế hủy xương được gây ra bởi Rankl trên mô hình cá bệnh loãng xương *rankl:HSE:CFP*. Kết quả này khẳng định sự tương đồng về ảnh hưởng của RES làm ức chế hủy xương gây ra bởi Rankl của mô hình cá với các mô hình động vật có vú.

KẾT LUẬN

Những đóng góp mới của luận án

1. Tìm được dòng cá *rankl:HSE:CFP* phù hợp (dòng c1c8), bổ sung một số chỉ số để hoàn thiện được qui trình sử dụng dòng cá này cho việc đánh giá tác dụng bảo vệ xương của các chất: chế độ sốc nhiệt với thời gian 90 phút ở nhiệt độ 39°C; nồng độ dung môi DMSO được dùng để hòa tan chất có thể xử lý trên cá là dưới 0,5%; nồng độ alendronat có thể được sử dụng làm đối chứng dương là 25µg/ml hay 50 µg/ml.
- 2... Khẳng định tác dụng ức chế hủy xương của hai thuốc chống loãng xương bisphosphonat thông dụng là alendronat và etidronat trên mô hình cá medaka *rankl:HSE:CFP* khi được phân tích bằng cách nhuộm xương cố định. Kết quả này góp phần xây dựng được phương pháp I_M xác định mức độ khoáng hóa và tổn thương xương của cá.
3. Lần đầu tiên xác định được dung môi DMSO có thể ảnh hưởng đến mức độ tổn thương xương gây ra bởi Rankl trên cá medaka và đưa ra khuyến cáo về việc sử dụng DMSO cho nghiên cứu trên cá này.
4. Khẳng định được resveratrol có tác dụng làm giảm tổn thương xương gây ra bởi Rankl trên cá *rankl:HSE:CFP* mô hình bệnh loãng xương.
5. Lần đầu tiên cho thấy chất tổng hợp NecroX5 có tác dụng bảo vệ xương trên cá medaka thể hiện qua tác dụng ức chế hủy xương và kích thích tạo xương. Điều này gợi ý tiềm năng nghiên cứu phát triển chất và các hợp chất NecroX thành thuốc chống loãng xương.

Thêm vào đó, các kết quả nghiên cứu của luận án khẳng định thêm giá trị của cá medaka *rankl:HSE:CFP* làm mô hình nghiên cứu loãng xương và góp phần phát triển việc dùng cá làm động vật mô hình nghiên cứu ở Việt Nam, tiệm cận với nghiên cứu trên thế giới

NGHIÊN CỨU TIẾP THEO

Với những kết quả nghiên cứu thu được, chúng tôi đề xuất nghiên cứu tiếp các nghiên cứu tiếp theo như sau:

1. Nghiên cứu tác dụng bảo vệ xương của resveratrol ở cá ở mức độ phân tử và tế bào, đặc biệt nghiên cứu tác dụng kích thích tạo xương của resveratrol, đánh giá thông qua các tế bào tạo xương và biểu hiện của các gen tạo xương ở những giai đoạn phát triển khác của cá.
2. Nghiên cứu tác dụng của necroX5 ở mức độ phân tử cho các gen hủy xương và tạo xương khác
3. Nghiên cứu khả năng liên quan giữa tác dụng bảo vệ xương của các hai chất resveratrol và necroX5 và tác dụng chống oxy hóa của hai chất này

DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH KHOA HỌC LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN

1. Trần Thị Thùy Trang, Phạm Văn Cường, Phạm Thị Thanh, **Hà Thị Minh Tâm**, Trần Đức Long, Tô Thanh Thúy* (2017). Thời gian sốc nhiệt và mức độ tổn thương xương của ấu trùng cá medaka chuyển gen *rankl*: HSE: CFP dòng c1c8 làm mô hình bệnh loãng xương. *Tạp chí Khoa học ĐHQGHN: Khoa học Tự nhiên và Công nghệ*, Tập 33, Số 2S (2017) 248-255
2. Cuong Van Pham, Thanh Thi Pham, Thuy Thi Lai, Dat Cong Trinh, Huong Vuong Minh Nguyen, **Tam Thi Minh Ha**, Thuong Thien Phuong, Long Duc Tran, Christoph Winkler, Thuy Thanh To* (2020). Icarin reduces bone loss iRankl-induced transgenic medaka (*Oryzias latipes*) model for osteoporosis. *J Fish Biol*:1-10. doi: 10.1111/jfb.14241 **(ISI, Q1)**
3. **Ha Thi Minh Tam** , Pham Tuan Phong , Le Uyen Nhu and To Thanh Thuy (2020). Analysis of osteoporosis-like phenotype of the *Rankl*:HSE:CFP homozygous transgenic medaka fish line c1c6 model for osteoporosis. *Natural Sciences* 2020, Volume 65, Issue 10, pp. 164-172
4. To Thanh Thuy* , Nguyen Thi Thu Ha, Nguyen Tuong Anh, **Ha Thi Minh Tam**, Nguyen Huy Manh, Tran Thi Thuy Chinh, Tran Duc Long (2022). Stability of the transgene reporter for osteoblasts in the transgenic *coll10a1:nlgfp* medaka fish (*oryzias latipes*). *Viet Nam Journal of Physiology*. 26 (3):1-8.